

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PCT/EP2004/051877

## PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



6.9.04

REC'D 16 SEP 2004

WIPO PCT

### Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 103 40 965.3

Anmeldetag: 05. September 2003

Anmelder/Inhaber: Leica Microsystems Heidelberg GmbH,  
68165 Mannheim/DE

Bezeichnung: Rastermikroskop

IPC: G 02 B, G 01 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 28. April 2004  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
im Auftrag

Agurks

### Rastermikroskop

Die Erfindung betrifft ein Rastermikroskop mit einem Anregungslichtstrahl zum optischen Anregen eines ersten Probenbereichs, mit einem 5 Stimulationslichtstrahl zum Auslösen einer stimulierten Emission in einem weiteren, zumindest teilweise mit dem ersten Probenbereich überlappenden Probenbereich, mit zumindest einem Objektiv zum Fokussieren des Anregungslichtstrahls und des Stimulationslichtstrahls und mit einem optischen Bauteil zur Beeinflussung der Form des Fokus des 10 Anregungslichtstrahls und/oder des Stimulationslichtstrahls.

In der Rastermikroskopie (Scannmikroskopie) wird eine Probe mit einem Lichtstrahl beleuchtet, um das von der Probe emittierte Reflexions- oder Fluoreszenzlicht zu beobachten. Der Fokus des Beleuchtungslightstrahles wird mit Hilfe einer steuerbaren Strahlablenkeinrichtung, im Allgemeinen durch 15 Verkippen zweier Spiegel, in einer Objektebene bewegt, wobei die Ablenkachsen meist senkrecht aufeinander stehen, so dass ein Spiegel in x- und der andere in y-Richtung ablenkt. Die Verkippung der Spiegel wird beispielsweise mit Hilfe von Galvanometer-Stellelementen bewerkstelligt. Die Leistung des vom Objekt kommenden Lichts wird in Abhängigkeit von der 20 Position des Abtaststrahles gemessen. Üblicherweise werden die Stellelemente mit Sensoren zur Ermittlung der aktuellen Spiegelstellung.

ausgerüstet. Neben diesen sogenannten strahlscannenden Methoden sind auch Scanmikroskope mit räumlich feststehendem Beleuchtungslichtstrahl bekannt, bei denen die Probe zur Abtastung mit Hilfe eines Feinpositioniertisches verfahren wird. Diese Scanmikroskope werden 5 objektscannend genannt.

Speziell in der konfokalen Rastermikroskopie wird ein Objekt mit dem Fokus eines Lichtstrahles in drei Dimensionen abgetastet.

Ein konfokales Rastermikroskop umfasst im Allgemeinen eine Lichtquelle, eine Fokussieroptik, mit der das Licht der Quelle auf eine Lochblende – die 10 sog. Anregungsblende – fokussiert wird, einen Strahlteiler, eine Strahlablenkeinrichtung zur Strahlsteuerung, eine Mikroskopoptik, eine Detektionsblende und die Detektoren zum Nachweis des Detektions- bzw. Fluoreszenzlichtes. Das Beleuchtungslicht wird über einen Strahlteiler eingekoppelt. Das vom Objekt kommende Fluoreszenz- oder Reflexionslicht 15 gelangt über die Strahlablenkeinrichtung zurück zum Strahlteiler, passiert diesen, um anschließend auf die Detektionsblende fokussiert zu werden, hinter der sich die Detektoren befinden. Detektionslicht, das nicht direkt aus der Fokusregion stammt, nimmt einen anderen Lichtweg und passiert die Detektionsblende nicht, so dass man eine Punktinformation erhält, die durch 20 sequentielles Abtasten des Objekts zu einem dreidimensionalen Bild führt. Meist wird ein dreidimensionales Bild durch schichtweise Bilddatenaufnahme erzielt.

Eine Anordnung zur Steigerung des Auflösungsvermögens für 25 Fluoreszenzanwendungen ist aus der DE 44 16 558 bekannt. Hierbei werden die lateralen Randbereiche des Fokusvolumens des Anregungslichtstrahls mit einem Lichtstrahl einer anderen Wellenlänge, dem sog. Stimulationslichtstrahl, der von einem zweiten Laser emittiert wird, beleuchtet, um dort die vom Licht des ersten Lasers angeregten Probenbereiche stimuliert in den Grundzustand zurück zu bringen. Detektiert wird dann nur das spontan emittierte Licht aus 30 den nicht vom zweiten Laser beleuchteten Bereichen, so dass insgesamt eine Auflösungsverbesserung erreicht wird. Für dieses Verfahren hat sich die Bezeichnung STED (Stimulated Emission Depletion) eingebürgert.

Aus DE 100 12 462 A1 ist eine Vorrichtung zur Beleuchtung eines Objekts vorzugsweise bei der konfokalen Fluoreszenzrastermikroskopie mit einem Beleuchtungsstrahlengang einer Lichtquelle und mindestens einem weiteren Beleuchtungsstrahlengang einer weiteren Lichtquelle, wobei die 5 Beleuchtungsstrahlengänge zumindest teilweise einander überlagerbar sind, bekannt. Die Vorrichtung ist zur Vereinfachung der Justierung sowie zur Reduktion der optischen Bauteile im Beleuchtungsstrahlengang dadurch gekennzeichnet, dass mindestens in einem der Beleuchtungsstrahlengänge mindestens ein optisches Bauteil angeordnet ist, wobei die optischen 10 Eigenschaften des Bauteils derart beeinflussbar bzw. veränderbar sind, dass sich das Beleuchtungsmuster des Beleuchtungsstrahlengangs im Objektbereich in seiner Form verändert. Das optische Bauteil kann hierbei beispielsweise als runde Phasenverzögerungsplatte, die in ihrem Durchmesser kleiner als der Strahldurchmesser ist und folglich überleuchtet 15 wird, ausgebildet sein. Als Phasenverzögerungsplatte wird ein optisches Bauteil bezeichnet, das eine ortsabhängige Phasenverzögerung des die Phasenverzögerungsplatte durchtretenden Lichts bewirkt. Die Phasenverzögerungsplatte ist im Strahlengang des eine stimulierte Emission auslösenden Beleuchtungsstrahls angeordnet und erzeugt bei geeigneter 20 Struktur einen hohlen Fokus, der eine Auflösungsverbesserung sowohl lateral als auch axial ermöglicht. Eine bevorzugte Ausgestaltung einer Phasenverzögerungsplatte besteht aus einem Substrat, auf das lokal in bestimmten Bereichen eine oder mehrere Schichten eines phasenverzögernd wirkenden Materials (beispielsweise  $MgF_2$ ) aufgebracht sind. Sind die Dicken 25 der Schichten und die Größen der Schichtbereiche so gewählt, dass die Hälfte der gesamten Lichtamplitude in der Pupille der Mikroskopoptik eine Phasenverzögerung von  $\lambda/2$  gegenüber der anderen Hälfte der Lichtamplitude besitzt, dann erzeugt die fokussierte Wellenfront im Fokus der Mikroskopoptik (Objektiv) destruktive Interferenz. Die resultierende PSF (Point Spread 30 Function) besitzt somit ein Minimum der Fokusmitte.

Die Verwendung von Phasenverzögerungsplatten in der STED-Mikroskopie wird beispielsweise auch in den folgenden Veröffentlichungen erwähnt: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 97, p. 8206-8210, 2000; Appl. Phys. Lett., Vol. 82,

No. 18, p. 3125-3127, 2003; Phys. Rev. Lett., Vol. 88, p. 163901-1 – 163901-4, 2002; Phys. Rev. E, Vol. 64, p. 066613-1 – 066613-9, 2001.

Anstelle von herkömmlichen Phasenverzögerungsplatten können auch LCDs oder programmierbare Lichtmodulatoren verwendet werden.

- 5 Eine Auflösungssteigerung in Richtung der optischen Achse lässt sich, wie in der Europäischen Patentschrift EP 0 491 289 mit dem Titel: „Doppelkonfokales Rastermikroskop“ beschrieben ist, durch eine Doppelobjektivanordnung (4Pi-Anordnung) erreichen. Das vom Beleuchtungssystem kommende Anregungslicht wird in zwei Teilstrahlen
- 10 aufgespalten, die die Probe einander entgegenlaufend durch zwei spiegelsymmetrisch angeordnete Objektive gleichzeitig beleuchten. Die beiden Objektive sind auf verschiedenen Seiten der ihnen gemeinsamen Objektebene angeordnet. Im Objektpunkt bildet sich durch diese interferometrische Beleuchtung ein Interferenzmuster aus, das bei
- 15 konstruktiver Interferenz ein Hauptmaximum und mehrere Nebenmaxima aufweist. Interferiert nur das Licht der Anregung, spricht man von 4Pi-Mikroskopie des Typs A, bei gleichzeitiger Interferenz des Detektionslichts von Typ C. Mit diesem doppelkonfokalen Rastermikroskop kann im Vergleich zum konventionellen Rastermikroskop durch die interferometrische Beleuchtung
- 20 eine erhöhte axiale Auflösung erzielt werden.

Durch eine Kombination von STED und doppelkonfokaler Anordnung lässt sich sowohl lateral, als auch axial eine Auflösungssteigerung erreichen.

- 25 In einer besonderen Kombination von einer STED- und einer doppelkonfokalen Anordnung, dem STED-4Pi-Mikroskop, wird mit Hilfe einer doppelkonfokalen Anordnung des Stimulationslichtstrahls eine destruktive Interferenz in der Fokusmitte erzeugt. Eine stimulierte Abregung ist somit auf den axialen Fokusrand beschränkt (Phys. Rev. Lett., vol. 88, p. 163901-1 – 163901-4, 2002).

- 30 Es hat sich gezeigt, dass zur Erzielung eines bestmöglichen Auflösungsvermögens das optische Bauteil vorzugsweise im Strahlengang des Stimulationslichtstrahles sehr exakt positioniert und justiert werden muss. Nachteiligerweise ist aufgrund dieses Umstandes nach jedem

Objektivwechsel eine aufwendige Nachjustierung und Anpassung des optischen Bauteils auf die baulichen und optischen Eigenschaften des neuen Objektivs erforderlich.

Es ist daher die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Rastermikroskop 5 anzugeben, mit dem bei wesentlich reduziertem Justieraufwand der theoretisch mögliche Auflösungsgrad erreichbar ist, und das gleichzeitig eine vereinfachte Anpassbarkeit an wechselnde Untersuchungsbedingungen – beispielsweise Objektivwechsel – bietet.

Die Aufgabe wird durch ein Rastermikroskop gelöst, das dadurch 10 gekennzeichnet ist, dass eine Optik zum Abbilden des optischen Bauteils in die Pupille des Objektivs vorgesehen ist, wobei die Größe des Abbildes des optischen Bauteils einstellbar ist.

Die Erfindung hat den Vorteil, dass zumindest eine Optik vorgesehen ist, die 15 das optische Bauteil in die Pupille des Objektivs abbildet, wobei die Größe des Abbildes des optischen Bauteils einstellbar ist.

Erfindungsgemäß wurde erkannt, dass zur Erzielung einer exakten Manipulation der Wellenfront des Anregungslichtstrahls bzw. des Stimulationslichtstrahls das optische Bauteil in der Pupille des Objektivs oder 20 in einer dazu konjugierten Ebene angeordnet sein muss. Vorzugsweise wirkt das optische Bauteil ausschließlich auf den Stimulationslichtstrahl und nicht auf den Anregungslichtstrahl. Da der Stimulationslichtstrahl und der Anregungslichtstrahl in der Regel vor dem Objektiv, beispielsweise durch einen dichroitischen Strahlteiler vereinigt werden, ist das optische Bauteil 25 vorzugsweise vor dem Strahlvereiniger im Strahlengang des Stimulationslichtstrahls angeordnet.

Als optisches Bauteil ist beispielsweise eine Verzögerungsplatte, die als Phasenverzögerungsplatte ausgeführt ist, verwendbar. In der Praxis weisen Phasenverzögerungsplatten aufgrund von Fertigungstoleranzen 30 Abweichungen von der geometrischen Idealform auf. Beispielsweise werden die Radien einer  $\lambda/2$ -Platte, wie sie in der bereits erwähnten Veröffentlichung (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 97, p. 8206-8210, 2000) verwendet werden, nicht mit den nominellen Radien übereinstimmen. Um dennoch die

gewünschte Wellenfront in der Pupille zu erreichen, wird erfindungsgemäß die Größe des Abbildes des optischen Bauteils in der Pupille angepasst.

In einer bevorzugten Ausgestaltungsform weist die Optik, die das optische Bauteil in die Pupille des Objektivs abbildet, verschiebbare Fokussiermittel, 5 wie beispielsweise Linsen oder Hohlspiegel, auf. In einer anderen Variante ist das Bauteil selbst vorzugsweise entlang der optischen Achse verschiebbar angeordnet. In einer besonders bevorzugten Ausgestaltungsform weist die Optik verschiebbare Fokussiermittel auf und das Bauteil selbst kann vorzugsweise entlang der optischen Achse verschiebbar angeordnet sein.

10 Zum Verschieben der Optik bzw. des optischen Bauteils ist vorteilhafterweise ein motorischer Antrieb vorgesehen. Das Verschieben der Fokussiermittel und/oder des optischen Bauteils erfolgt vorzugsweise derart, dass das Abbild des optischen Bauteils stets in der Pupille des Objektivs verbleibt und dass der Anregungslichtstrahl bzw. der Stimulationslichtstrahl das Objektiv als 15 paralleles Lichtbündel beleuchtet.

In einer anderen bevorzugten Variante ist die Optik als vorzugsweise motorisch einstellbare Variooptik ausgebildet. Diese kann einerseits zum Justieren des Systems oder andererseits zur Anpassung der Größe des Abbildes des optischen Bauteils auf verschiedene Pupillendurchmesser, 20 beispielsweise unterschiedlicher Objektive, verwendet werden.

Die Variooptik ist vorzugsweise so ausgestaltet, dass bei einer Veränderung ihrer Brennweite der Brennpunkt, der sich auf dem in die Pupille abzubildenden Bauteils gegenüberliegenden Seite der Variooptik befindet, 25 ortsfest bleibt. In einer ganz bevorzugten Ausgestaltung der Variooptik bleiben bei einer Brennweitenveränderung beide Brennpunkte der Variooptik ortsfest.

Anstelle der bereits erwähnten Möglichkeiten zum Einstellen der Größe des Abbildes des optischen Bauteils kann auch vorgesehen sein, die Optik gegen eine Optik mit anderen optischen Eigenschaften auszutauschen. Hierzu ist vorzugsweise ein als Revolver oder Schiebeschlitten ausgebildetes 30 Vorratsmittel vorgesehen, in dem unterschiedliche Optiken bevorratet sind, die vorzugsweise durch einfaches Drehen bzw. Schieben des Vorratsmittels in

den Strahlengang des Anregungs- bzw. Stimulationslichtstrahls eingebracht werden können. Vorzugsweise ist das Vorratsmittel motorisch angetrieben.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsvariante erfolgt die Einstellung der Größe des Abbildes des optischen Bauteils automatisch.

5 Vorzugsweise ist ein Mittel zum automatischen Erkennen des in den Strahlengang eingebrachten Objektivs vorgesehen, das es einem Steuerrechner ermöglicht, die für dieses Objektiv optimale, gegebenenfalls vorgespeicherte Einstellung vorzunehmen. Vorzugsweise erfolgt die Einstellung der Größe des Abbildes des optischen Bauteils in Abhängigkeit  
10 vom Durchmesser der Pupille des gewählten Objektivs.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausgestaltungsvariante ist das Rastermikroskop als konfokales oder als doppelkonfokales Rastermikroskop ausgebildet.

15 Die Pupillenebene ist eine Fourierebene zur Fokusebene des Objektivs und die Optik erzeugt eine weitere Fourierebene, in der das optische Bauteil angeordnet ist.????

In der Zeichnung ist der Erfindungsgegenstand schematisch dargestellt und wird anhand der Figuren nachfolgend beschrieben. Dabei zeigen:

Fig. 1 ein erfindungsgemäßes Rastermikroskop,  
20 Fig. 2 eine schematische Darstellung der Abbildung des optischen Bauteils in die Pupille des Objektivs,

Fig. 1 zeigt ein erfindungsgemäßes Rastermikroskop, das als konfokales Rastermikroskop ausgebildet ist. Das Rastermikroskop beinhaltet eine erste Lichtquelle 1, die einen Anregungslichtstrahl 3 zum optischen Anregen eines ersten Probenbereichs einer Probe 5 emittiert. Der Anregungslichtstrahl 3 wird mit der Optik 7 auf die Beleuchtungslochblende 9 fokussiert, passiert diese und wird anschließend von der weiteren Optik 11 kollimiert. Das Rastermikroskop umfasst eine weitere Lichtquelle 13, die einen Stimulationslichtstrahl 15 erzeugt, der mit der Linse 17 auf die Stimulationslochblende 19 fokussiert wird. Der durch die Stimulationslochblende 19 tretende Stimulationslichtstrahl 15 wird von der

weiteren Linse 21 kollimiert und durchläuft anschließend ein optisches Bauteil 23 zur Beeinflussung der Form des Fokus des Stimulationslichtstrahls 15. Das optische Bauteil 23 besteht aus einem Substrat 25, auf das eine PhasenverzögerungsPlatte 27, die als  $\lambda/2$ - Platte ausgestaltet ist und die 5 einen kleineren Durchmesser als den Durchmesser des Stimulationslichtstrahls 15 aufweist, angebracht ist. Eine Variooptik 29 fokussiert den durch das optische Bauteil 23 tretende Stimulationslichtstrahl 15 zu einem Fokus 31. Die Variooptik 29 ist so ausgestaltet, dass der Ort des Fokus 31 konstant bleibt, so dass gegebenenfalls nur das optische Bauteil 10 nachjustiert werden muss. Die Variooptik 29 ist bei diesem Rastermikroskop derart ausgebildet, dass die Lage ihrer vorderen Brennebene, in der sich der Fokus 31 befindet, und die Lage der hinteren Brennebene, in der das optische Bauteil angeordnet ist, stets konstant bleiben, um ein Nachjustieren des optischen Bauteils in axialer Richtung zu vermeiden. Der Anregungslichtstrahl 15 und der Stimulationslichtstrahl 15 werden mit Hilfe eines dichroitischen Strahlteilers 33 vereinigt und über den Hauptstrahlteiler 35 zu einer Strahlablenkeinrichtung 37, die einen kardanisch aufgehängten Scanspiegel 39 beinhaltet, gelenkt. Die Strahlablenkeinrichtung 37 führt den Anregungslichtstrahl 3 und den Stimulationslichtstrahl 15 gemeinsam durch 20 die Scanoptik 41, die Tubusoptik 43 und durch das Objektiv 45 über bzw. durch die Probe. Im Probenbereich überlappen die Fokusse des Anregungslichtstrahls und des Stimulationslichtstrahls zur Erzielung des STED-Effektes teilweise. Das von der Probe ausgehende Detektionslicht 47 gelangt durch das Objektiv 45, die Tubusoptik 43, die Scanoptik 41 und über 25 die Strahlablenkeinrichtung 37 zurück zum Hauptstrahlteiler 35, passiert diesen und trifft nach Passieren der Detektionslochblende 49 auf den als Photomultiplier 51 ausgebildeten Detektor 53. Zum Fokussieren des Detektionslichts 47 auf die Detektionslochblende 49 ist eine Fokussier-Optik 55 vorgesehen. Die zwischen dem optischen Bauteil 23 und dem Fokus 30 31 angeordnete Variooptik 29 und die zwischen dem Fokus 31 und dem dichroitischen Strahlteiler 33 angeordnete Linse 57 bilden gemeinsam mit der Scanoptik 41 und der Tubus-Optik 43 eine Optik, die das optische Bauteil 23 in die Pupille 59 des Objektivs 45 abbildet. Mit Hilfe der Variooptik 29 kann die

Größe des Abbildes des optischen Bauteils eingestellt werden. Dem Fachmann ist hierbei klar, dass im Normalbetrieb des Rastermikroskops in der Pupille 59 des Objektivs 45 kein reales sichtbares Abbild des optischen Bauteils existiert.

5 Fig. 2 illustriert, wie die aus der Variooptik 29 der Linse 57, der Scanoptik 41 und der Tubus-Optik 43 gebildete Optik das optische Bauteil in die Pupille des Objektivs abbildet. Hierbei handelt es sich um eine schematische Illustration eines Strahlenganges (durchgezogene Linien), der im Normalbetrieb des Rastermikroskops nicht vorhanden ist. Vielmehr handelt es sich um einen  
10 Fourier-Strahlengang, wie er beispielsweise auch zur Illustration der Köhler'schen Beleuchtung fachüblicherweise eingezeichnet wird.

Die Erfindung wurde in Bezug auf eine besondere Ausführungsform beschrieben. Es ist jedoch selbstverständlich, dass Änderungen und Abwandlungen durchgeführt werden können, ohne dabei den Schutzbereich  
15 der nachstehenden Ansprüche zu verlassen.

**Bezugszeichenliste:**

- 1      Lichtquelle
- 3      Anregungslichtstrahl
- 5      5      Probe
- 7      Optik
- 9      Beleuchtungslochblende
- 11     weitere Optik
- 13     weitere Lichtquelle
- 10     15     Stimulationslichtstrahl
- 17     Linse
- 19     Stimulationslochblende
- 21     Linse
- 23     optisches Bauteil
- 15     25     Substrat
- 27     Phasenverzögerungsplatte
- 29     Variooptik
- 31     Fokus
- 33     Strahlteilers
- 20     35     Hauptstrahlteiler
- 37     Strahlablenkeinrichtung
- 39     Scanspiegel
- 41     Scanoptik
- 43     Tubusoptik
- 25     45     Objektiv
- 47     Detektionslicht

- 49 Detektionslochblende
- 51 Photomultiplier
- 53 Detektor
- 55 Fokussieroptik
- 5 57 Linse
- 59 Pupille

Patentansprüche

1. Rastermikroskop mit einem Anregungslichtstrahl zum optischen Anregen eines ersten Probenbereichs, mit einem Stimulationslichtstrahl zum Auslösen einer stimulierten Emission in einem weiteren, zumindest teilweise mit dem ersten Probenbereich überlappenden Probenbereich, mit zumindest einem Objektiv zum Fokussieren des Anregungslichtstrahls und des Stimulationslichtstrahls und mit einem optischen Bauteil zur Beeinflussung der Form des Fokus des Anregungslichtstrahls und/oder des Stimulationslichtstrahls, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest eine Optik zum Abbilden des optischen Bauteils in die Pupille des Objektivs vorgesehen ist, wobei die Größe des Abbildes des optischen Bauteils einstellbar ist.
2. Rastermikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Optik verschiebbare Fokussiermittel umfasst.
3. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das optische Bauteil verschiebbar angeordnet ist.
4. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Optik und/oder das optische Bauteil motorisch verschiebbar sind.
5. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Optik eine – vorzugsweise motorisch einstellbare - Variooptik umfasst.

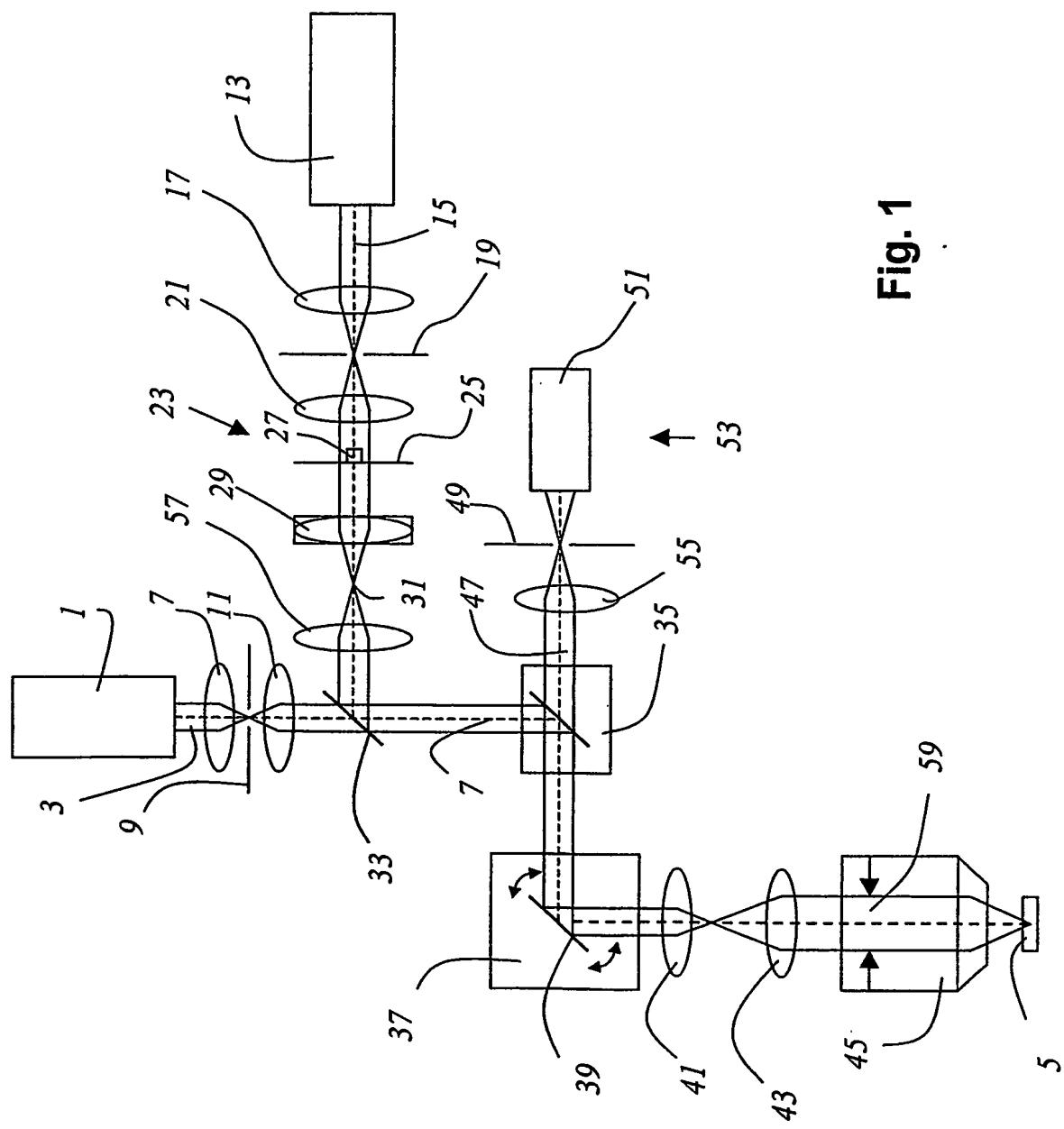
6. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Optik austauschbar ist.
7. Rastermikroskop nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass ein Vorratsmittel vorgesehen ist, das Optiken unterschiedlicher optischer Eigenschaften bevatrat.
8. Rastermikroskop nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Vorratsmittel einen Revolver oder einen Schiebeschlitten umfasst.
9. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Vorratsmittel motorisch angetrieben ist.
10. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Einstellung der Größe des Abbildes des optischen Bauteils automatisch erfolgt.
11. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Einstellung der Größe der Abbildes des optischen Bauteils in Abhängigkeit von dem Durchmesser der Pupille des Objektivs erfolgt.
12. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass das optische Bauteil eine Phasenverzögerungsplatte umfasst.
13. Rastermikroskop nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Phasenverzögerungsplatte eine  $\lambda/2$ -Platte ist.
14. Rastermikroskop nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Phasenverzögerungsplatte lokal in verschiedenen Bereichen unterschiedliche Phasenverzögerungen bewirkt.
15. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass das optische Bauteil ausschließlich auf den Stimulationslichtstrahl wirkt.

16. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass das Rastermikroskop ein konfokales Rastermikroskop oder ein doppelkonfokales Rastermikroskop ist.

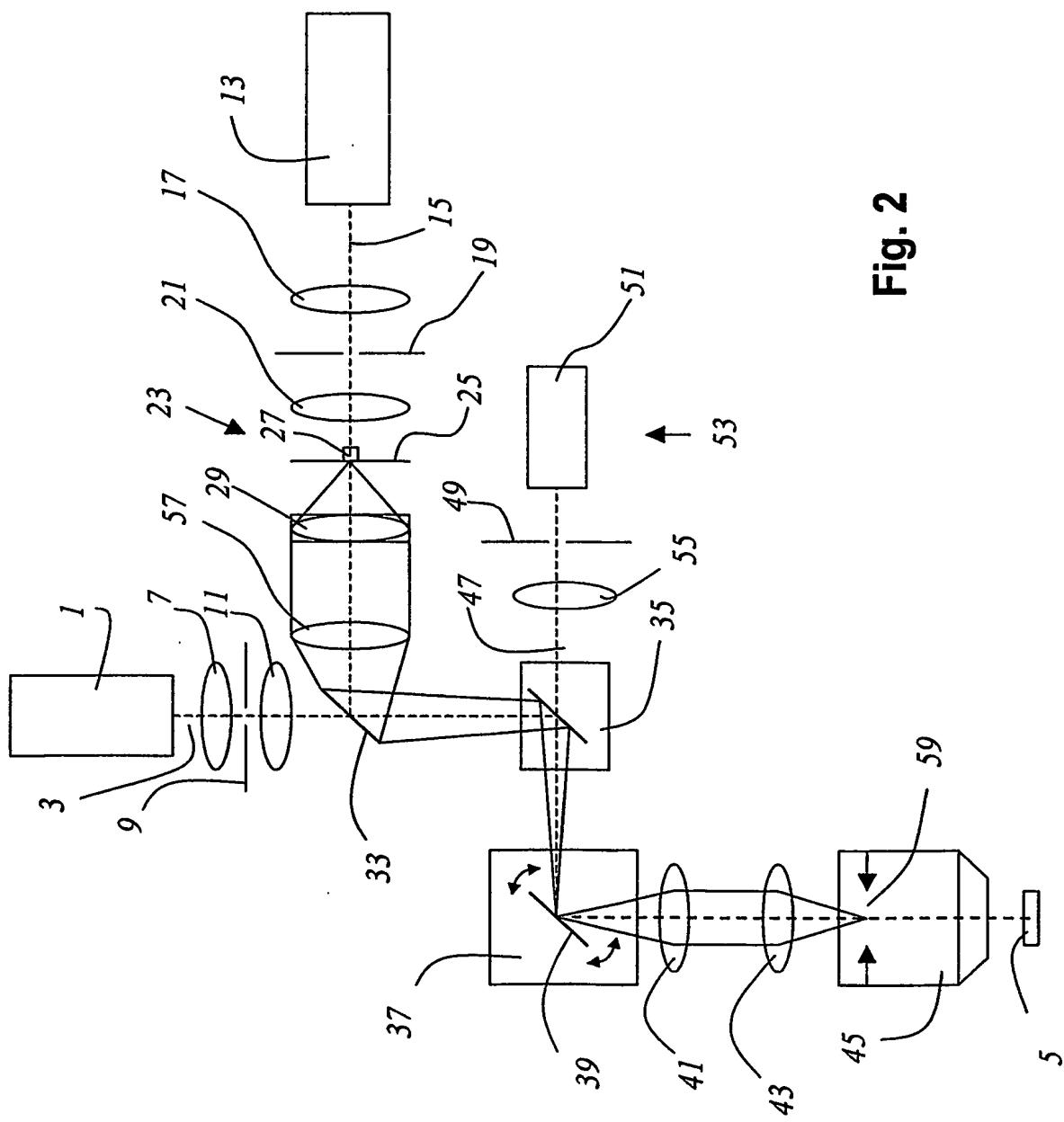
Zusammenfassung

Ein Rastermikroskop mit einem Anregungslichtstrahl zum optischen Anregen eines ersten Probenbereichs, mit einem Stimulationslichtstrahl zum Auslösen einer stimulierten Emission in einem weiteren, zumindest teilweise mit dem ersten Probenbereich überlappenden Probenbereich, mit zumindest einem Objektiv zum Fokussieren des Anregungslichtstrahls und des Stimulationslichtstrahls und mit einem optischen Bauteil zur Beeinflussung der Form des Fokus des Anregungslichtstrahls und/oder des Stimulationslichtstrahls ist offenbart. Das Rastermikroskop ist dadurch gekennzeichnet, dass zumindest eine Optik zum Abbilden des optischen Bauteils in die Pupille des Objektivs vorgesehen ist, wobei die Größe des Abbildes des optischen Bauteils einstellbar ist.

Fig. 1



**Fig. 1**



**Fig. 2**